

Kit SPOT-Light® HER2 CISH



N. cat. 84-0150



20 test con vetrini coprioggetto da 24 x 30 mm

Uso previsto



Per uso diagnostico *in vitro*

Il kit SPOT-Light® HER2 CISH è destinato alla determinazione quantitativa dell'amplificazione del gene HER2 in sezioni di tessuto mammario neoplastico incluse in paraffina e fissate in formalina (FFPE) tramite l'utilizzo dell'ibridazione *in situ* cromogenica (CISH) e la microscopia in campo chiaro. Il test deve essere eseguito in un laboratorio di istopatologia.

Il kit SPOT-Light® HER2 CISH è indicato come ausilio nella valutazione di pazienti candidate a un eventuale trattamento con Herceptin® (trastuzumab). I risultati del dosaggio servono come informazioni aggiuntive ai dati clinicopatologici attualmente in uso come parte della gestione di pazienti con carcinoma mammario. L'interpretazione dei risultati del test deve essere effettuata da un patologo qualificato, nel contesto anamnestico della paziente.

Sommario e spiegazione

Il gene umano HER2, o *c-erbB-2*, e il gene equivalente nel ratto, *neu*, sono stati identificati come proto-oncogeni⁽¹⁻³⁾ che condividono un'omologia con l'oncogene strettamente correlato *v-erbB*.⁽¹⁾ Il gene HER2 è situato sul cromosoma 17 (17q11.2-21) e codifica per una proteina di membrana simil-recettoriale di 185 kDa. La proteina HER2 possiede attività di tirosina chinasi e condivide un'omologia con il recettore del fattore di crescita epidermica (noto come EGFr, HER1, o *c-erbB-1*), pur differenziandosi da esso.⁽²⁾

L'amplificazione del gene HER2 o l'iperespressione della proteina HER2 è stata identificata nel 18–30% dei carcinomi mammari nell'uomo.⁽⁸⁻⁹⁾ L'identificazione dello stato di amplificazione del gene HER2 è importante per la determinazione della prognosi in pazienti con diagnosi di carcinoma mammario invasivo, oltre che per la selezione di pazienti candidate alla terapia con trastuzumab (Herceptin®, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basilea, Svizzera e Genentech, Inc., South San Francisco, CA).⁽⁴⁻⁶⁾ Trastuzumab è un anticorpo monoclonale specifico per la proteina HER2. È stato dimostrato che trastuzumab rappresenta una terapia efficace solo in pazienti i cui tumori evidenziano un'amplificazione del gene HER2 e/o un'iperespressione della proteina HER2.^(7,11) Nelle fasi iniziali del carcinoma mammario, un breve ciclo di trastuzumab somministrato in associazione a docetaxel o vinorelbina si è dimostrato efficace nelle donne affette da carcinoma mammario che presentavano un'amplificazione del gene *HER2/neu*.⁽¹²⁾ Altri studi hanno inoltre dimostrato che lo stato di HER2 è in grado di anticipare la sensibilità o la resistenza ad alcuni regimi chemioterapici.⁽¹³⁾ Per questo motivo è diventato sempre più importante avere a disposizione metodi semplici, precisi e coerenti per la valutazione dello stato del gene HER2 e della proteina HER2.

Principi della procedura

La tecnica CISH utilizza sonde a DNA marcate con digossigenina specifiche per il locus del gene HER2 sul cromosoma 17q11.2-21 da ibridizzare con gli acidi nucleici complementari presenti nel campione di tessuto mammario neoplastico. La sonda HER2 marcata viene prodotta utilizzando la Subtraction Probe Technology (SPT™), una tecnologia esclusiva e brevettata che permette di creare sonde riducendo in modo significativo le sequenze ripetitive (ad es., gli elementi Alu e LINE) osservate negli acidi nucleici umani. Tramite PCR è stato dimostrato che la sonda contiene il gene HER2 e che si lega in modo specifico al locus del gene HER2 sul cromosoma 17q11.2-21 tramite FISH in metafase nei linfociti normali. Di conseguenza le sonde SPT™ Invitrogen sono intrinsecamente specifiche e non richiedono il blocco delle sequenze ripetute, necessario con le tradizionali sonde citogenetiche a DNA. La tecnica CISH consente la valutazione delle aberrazioni genetiche con microscopio a campo chiaro utilizzando l'identificazione cromogenica.

I risultati della colorazione CISH possono essere facilmente visualizzati con un microscopio in campo chiaro e un obiettivo a secco da 40X. Lo stato di amplificazione del gene HER2 può essere visualizzato nel contesto della morfologia dei tessuti circostanti.

Dopo la sparaffinatura, i campioni vengono pretrattati con una fase di smascheramento termindotto seguita da una digestione enzimatica. I campioni vengono quindi disidratati ed essiccati all'aria prima di aggiungere la sonda HER2. Dopo l'aggiunta della sonda e il posizionamento del vetrino coprioggetto sul campione, l'insieme viene denaturato e ibridato per più di 10 ore o per tutta la notte. A questo punto il campione viene lavato per rimuovere la sonda non ibridata e il segnale viene identificato per via cromogenica tramite l'aggiunta sequenziale di anticorpi anti-digossigenina coniugati con perossidasi di rafano (HRP). Il colore si forma dalla reazione dell'HRP legato con il cromogeno DAB e il substrato H₂O₂. Infine, viene eseguita la colorazione di contrasto del campione con ematossilina di Mayer per identificare la morfologia dei tessuti e quindi viene posto un vetrino coprioggetto. Il segnale del gene HER2 è rappresentato da un singolo punto bruno scuro, se presente in un basso numero di copie, oppure da cluster di colore bruno, se il segnale rappresenta numerose copie. Le aree delle cellule tumorali possono essere facilmente identificate con l'obiettivo a basso ingrandimento di un microscopio in campo chiaro e le copie del gene HER2 vengono quantificate utilizzando un obiettivo 40X. La rilevazione delle cellule tumorali e la quantificazione delle copie del gene HER2 avvengono quindi con un microscopio in campo chiaro e un obiettivo 40X. Il DAB forma un precipitato colorato in modo da permettere di archiviare i risultati per una valutazione successiva.

Materiali forniti

Il kit SPOT-Light® HER2 CISH contiene tutti i reagenti necessari per eseguire la procedura CISH su campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina. I materiali elencati di seguito sono sufficienti per eseguire un totale di 20 test e fino a 2 analisi con i due vetrini di controllo, utilizzando campioni di tessuto da 24 x 30 mm con vetrino coprioggetto. Se vengono utilizzati vetrini coprioggetto più piccoli, è possibile eseguire ulteriori test.

Il kit SPOT-Light® HER2 CISH viene fornito con pacchetti refrigeranti. Al momento della consegna tali pacchetti devono essere ancora freddi, per assicurare che la confezione non sia stata esposta ad alte temperature. Tuttavia, anche se alcuni componenti non dovessero essere congelati, questo non influenza le prestazioni del kit. Fare riferimento a **Conservazione dei reagenti** per l'immediato stoccaggio di questi componenti dopo la consegna.

Reagente A. Soluzione per pretrattamento termico

1 l, contenente tampone tris-EDTA (pronto all'uso)

Reagente B. Reagente per pretrattamento enzimatico

5 ml, contenente una soluzione di pepsina con sodio azide 0,05% e detergente (pronto all'uso)

ATTENZIONE: nocivo

Reagente C. Sonda HER2

0,4 ml, sonda HER2 SPOT-Light® marcata con digossigenina in tampone di ibridazione contenente formammide (pronto all'uso)

ATTENZIONE: nocivo

Reagente D. Tampone SSC

500 ml, contenente sodio citrato (SSC) (pronto all'uso)

Reagente E1. PBS in polvere

3 confezioni, ciascuna sufficiente per 1 l di PBS

Reagente E2. Tween 20 (50%)
2 ml, Tween 20 in soluzione al 50%

Reagente F. CAS-Block™
3 ml, contenente tampone, stabilizzante e sodio azide 0,1% (pronto all'uso)
ATTENZIONE: nocivo

Reagente G. Anticorpi anti-digossigenina murini
3 ml, contenente BSA, tampone e sodio azide 0,1% (pronto all'uso)
ATTENZIONE: nocivo

Reagente H. Anticorpi di capra anti-topo coniugati con HRP
3 ml, contenente stabilizzante, tampone, gentamicina solfato 0,005% e Proclin 300 0,1%, (pronto all'uso)

Reagente I1. Tampone substrato DAB (20x)
1 ml, concentrato contenente tampone

Reagente I2. Soluzione DAB, (20x)
1 ml, concentrato contenente 85% (p/v) di metanolo
ATTENZIONE: infiammabile e tossico

Reagente I3. Perossido di idrogeno (20x)
1 ml, 0,6% di H₂O₂

Reagente J. Ematossilina di Mayer
100 ml (pronto all'uso)

Reagente K. Soluzione di montaggio Histomount™
4 ml (pronto all'uso)
ATTENZIONE: altamente infiammabile e nocivo

Vetrino di controllo L. Vetrino con cellule per procedura di controllo
2 vetrini, ciascuno con due linee cellulari fissate in formalina e incluse in paraffina (FFPE), posizionate una accanto all'altra:
A) *HER2* non amplificato (MCF-7) e
B) *HER2* amplificato (SK-OV-3)
[per un controllo ottimale del dosaggio si consiglia l'utilizzo della linea cellulare non amplificata con risultati conteggiabili]

REAGENTI/MATERIALI E APPARECCHIATURA NECESSARI MA NON FORNITI

Reagenti/materiali ausiliari

N. cat. Invitrogen

1. Vetrini portaoggetto SuperFrost Plus **OPPURE**
Vetrini portaoggetto adesivi Histogrip™ 00-8050
2. Tessuto per il controllo positivo: sezione di tessuto di carcinoma mammario FFPE (di tipo duttale, tubulare, lobulare o misto) con amplificazione del gene *HER2* precedentemente confermata con CISH o FISH
3. Tessuto per il controllo negativo: sezione di tessuto di carcinoma mammario FFPE (di tipo duttale, tubulare, lobulare o misto) con assenza di amplificazione del gene *HER2* precedentemente confermata con CISH o FISH
4. Acqua deionizzata o distillata (dH₂O)
5. Xilene
6. Etanolo al 70%, 85%, 95% e 100% (EtOH)
7. Vetrini coprioggetto, colla polimerica, ago da 18G x 12 mm e siringa da 5 ml **OPPURE**
8. Coprivetrino UnderCover™ (18 x 18 mm) 00-8403
9. Coprivetrino UnderCover™ (22 x 22 mm) 00-8404
10. Perossido di idrogeno al 30% (H₂O₂)
11. Metanolo al 100%

Apparecchiatura

1. Cronometro
2. Pipette (20 µl, 1000 µl)
3. Puntali
4. Rack portavetrini
5. Piastra riscaldante, fogli di alluminio e becher da 1 l
6. Riscaldatore per vetrini
7. Incubatrice a 37 °C
8. Ciclatore termico per PCR con comparto vetrini **OPPURE**
Blocco riscaldante con termometro digitale e incubatore a 37 °C (± 1 °C) e camera di umidificazione per vetrini
9. Bagno termostatico (in grado di mantenere un intervallo di temperatura di 70–80 °C) con un termometro calibrato
10. Vaschette Coplin e vaschette per colorazione
11. Microscopio in campo chiaro con obiettivi 20X e 40X

Precauzioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Per operatori professionisti addestrati all'uso.
- **Non** utilizzare il kit dopo la data di scadenza stampata sull'etichetta.
- Se il prodotto viene conservato in condizioni diverse da quelle specificate nelle istruzioni allegate, è necessario che tali condizioni siano verificate dall'operatore.
- Non mangiare, bere, fumare o utilizzare cosmetici in prossimità dell'area dove vengono manipolati i materiali del kit. Osservare le buone pratiche generali di laboratorio.
- Nessuno dei metodi di analisi disponibili è in grado di offrire la certezza assoluta dell'eliminazione dei potenziali rischi biologici. Maneggiare tutti i materiali con un livello di biosicurezza 2, come raccomandato per tutti i materiali di origine umana a potenziale rischio infettivo nel manuale pubblicato dai Centers for Disease Control/National Institutes for Health statunitensi "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4^a edizione, aprile 1999.
- Non pipettare i reagenti con la bocca ed evitare il contatto di pelle e mucose con i campioni e i reagenti. Se i reagenti vengono a contatto con la pelle o le mucose, risciacquare le aree contaminate con abbondante acqua.
- I reagenti B, F e G contengono sodio azide allo 0,1%, il reagente H contiene gentamicina solfato allo 0,005% e Proclin allo 0,1%, il reagente I2 contiene l'85% (p/v) di metanolo e il reagente I3 contiene perossido di idrogeno allo 0,6%. Alla concentrazione presente nei prodotti questi reagenti non devono essere contrassegnati come nocivi. Per ulteriori informazioni, fare riferimento all'MSDS specifico per il componente.
- Il reagente B contiene pepsina e questo enzima può causare reazioni allergiche se viene a contatto con la pelle.
- Per ottenere risultati ottimali, utilizzare un bagno termostatico calibrato, un blocco riscaldante e un forno per ibridazione.
- Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o di rame e formare azidi metalliche esplosive, specialmente dopo un accumulo. Quando vengono smaltiti i reagenti contenenti sodio azide, risciacquare abbondantemente con acqua per evitare l'accumulo di sostanze chimiche pericolose nelle tubature.
- Alcuni reagenti di questo kit contengono Proclin, sodio azide o perossido di idrogeno. Questi reagenti vengono classificati come nocivi in quanto irritanti per pelle e mucose. Queste sostanze vengono fornite in forma diluita come componenti del kit; di conseguenza il rischio di esposizione viene ridotto al minimo, anche se non completamente eliminato. Evitare il contatto con pelle, occhi e indumenti. Per ulteriori informazioni, fare riferimento all'MSDS specifico per il componente.
- Il 3,3-diaminobenzidina tetracloruro (DAB) può risultare dannoso se ingerito, inalato o assorbito attraverso la pelle e può essere irritante per occhi, pelle, mucose e prime vie respiratorie. Il DAB è un sospetto cancerogeno; consultare le normative federali, statali e/o locali per le raccomandazioni sul suo smaltimento.
- Evitare l'evaporazione del reagente I2. Il metanolo evapora facilmente. Fare il possibile per evitarne l'evaporazione, ad esempio sigillando il contenitore e chiudendo immediatamente il coperchio dopo l'uso. L'evaporazione del metanolo può causare la precipitazione del DAB, influenzando eventualmente i risultati della colorazione.
- Evitare l'evaporazione durante l'ibridazione controllando che i vetrini siano stati sigillati correttamente e che sia presente un'umidità adeguata nella camera di ibridazione.

- Il pretrattamento enzimatico può variare a seconda della fissazione e dello spessore dei tessuti. Per la maggioranza delle sezioni di tessuto (4–5 µm) fissate in formalina tamponata neutra al 10%, si considera ottimale un pretrattamento enzimatico di 5 minuti. Per i tessuti di cui non è nota la fissazione, è necessario eseguire una titolazione enzimatica (ad es., 2, 5 e 10 minuti) modificando il tempo di digestione ottimale in base ai risultati iniziali.
- **Reagente C** – sonda HER2 marcata contenente formammide, una sostanza nociva.
R21 – Nocivo a contatto con la pelle.
R22 – Nocivo in caso di ingestione.
R61 – Può danneggiare i bambini non ancora nati.
S24 – Evitare il contatto con la pelle.
S36 – Indossare un indumento di protezione adeguato.
S37 – Indossare guanti adeguati.
S39 – Far uso di un apparecchio di protezione degli occhi e del viso.
- **Reagente I2** – la soluzione di DAB contiene metanolo, una sostanza infiammabile e tossica. Per ulteriori informazioni fare riferimento all'MSDS.
R10 – Infiammabile
R23/24/25 – Tossico per inalazione, ingestione e contatto con la pelle.
S45 – In caso d'infortunio o di malore, consultare immediatamente un medico.
S36 – Indossare un indumento di protezione adeguato.
S37 – Indossare guanti adeguati.
- **Reagente K** – la soluzione di montaggio Histomount contiene toluene, una sostanza altamente infiammabile e nociva se inalata. Per ulteriori informazioni fare riferimento all'MSDS.
R11 – Molto infiammabile.
R20 – Nocivo per inalazione.
S2 – Conservare fuori portata dei bambini.
S16 – Conservare lontano da qualsiasi fonte di infiammazione. Non fumare.
S25 – Evitare il contatto con gli occhi.
S29 – Non gettare i residui nelle condotte fognarie.
S33 – Evitare l'accumulo di cariche elettrostatiche.
- Tutti i reagenti contrassegnati come pronti all'uso sono stati diluiti in modo ottimale. Un'ulteriore diluizione potrebbe influenzare negativamente i risultati del dosaggio.
- I tempi di incubazione, i reagenti e le temperature sono state ottimizzate. L'uso di tempi di incubazione, reagenti o temperature diversi potrebbe influenzare negativamente i risultati del dosaggio.
- Si sconsiglia l'uso di fissativi o spessori diversi per i tessuti, in quanto ciò potrebbe influenzare negativamente i risultati del dosaggio.
- Consultare le normative locali per lo smaltimento dei componenti potenzialmente tossici.
- Ridurre al minimo la contaminazione microbica per evitare colorazioni non specifiche.
- Prestare estrema attenzione durante la manipolazione dei reagenti. Indossare guanti protettivi, camice e occhiali di sicurezza quando si manipolano sostanze cancerogene.

Conservazione dei reagenti

- Conservare il kit SPOT-Light® HER2 CISH a 2–8 °C.
- Conservare il **reagente J** a temperatura ambiente (15–30 °C).
Nota: il reagente B può subire alterazioni se esposto ad alte temperature. Conservare questo reagente a 2–8 °C immediatamente dopo l'uso. Non conservarlo a temperatura ambiente.
- Conservare il tampone PBS/Tween 20 attivo a temperatura ambiente (15–30 °C) per un periodo non superiore a una settimana.

Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza stampata sull'etichetta. Se il prodotto viene conservato in condizioni diverse da quelle specificate nelle istruzioni allegate, è necessario che tali condizioni siano verificate dall'operatore. Non esistono segni visibili per indicare l'instabilità di questo prodotto; per questo motivo è importante esaminare i vetrini di controllo. Se si sospetta un problema con il kit, contattare l'Assistenza tecnica.



A. Preparazione dei campioni

Sezioni di tessuto incluse in paraffina:

- Sono idonei per l'uso tessuti fissati in formalina tamponata neutra per 6–48 ore prima dell'inclusione in paraffina.
- Fissativi diversi dalla formalina tamponata neutra al 10% non sono stati ottimizzati per questo protocollo e non sono idonei per l'uso.
- Le sezioni di tessuto (4–5 µm di spessore) devono essere montate su vetrini per microscopio HistoGrip™ o Superfrost Plus. Se possibile, utilizzare sezioni di tessuto di spessore standardizzato al fine di assicurare l'uniformità della colorazione con tecnica di identificazione CISH e dei reagenti per la colorazione di contrasto.²⁸
- Asciugare i vetrini all'aria o a 37 °C e quindi mettere nel forno per 2–4 ore a 60 °C.
- I tessuti fissati e inclusi correttamente si mantengono a tempo indeterminato, prima della preparazione delle sezioni e del montaggio su vetrino, se conservati in un luogo fresco e asciutto (15–30 °C).^{26,27}
- Le sezioni di tessuto con spessore di 2–3 µm possono fornire risultati con un numero di copie di geni erroneamente basso.

B. Procedura CISH standard per sezioni di tessuto FFPE

Note sulla procedura

- Tutti i reagenti tranne il **reagente C** (sonda HER2) devono essere portati a temperatura ambiente (15–30 °C) prima dell'uso. La sonda HER2 può essere utilizzata fredda, senza portarla a temperatura ambiente. Ogni incubazione deve essere eseguita a temperatura ambiente (15–30 °C), a meno che non sia indicato diversamente.
- A meno che non sia indicato diversamente, nel corso dell'intera procedura è importante evitare l'essiccazione della sezione di tessuto tra le diverse fasi.
- Nel corso della procedura è necessario eseguire diversi lavaggi. Utilizzare nuova soluzione ad ogni lavaggio.
- I **vetrini di controllo** devono essere analizzati insieme ad ogni analisi dei vetrini del paziente e devono essere trattati allo stesso modo dei campioni di analisi durante tutte le fasi.
- A meno che non sia indicato diversamente, tutte le fasi vengono eseguite a temperatura ambiente (15–30 °C).
- Per completare questa procedura sono necessarie più di otto ore. Di seguito viene riportata una comoda suddivisione di questo periodo. Il giorno 1 si inizia con la **sparaffinatura** per poi passare alla **denaturazione** e alla **ibridazione** (per tutta la notte) e proseguendo il giorno 2 con il **lavaggio stringente** fino all'**esame microscopico in campo chiaro**.
- Per la procedura CISH sono necessari i reagenti Invitrogen forniti con il kit. L'utilizzo di altri reagenti può causare un elevato sottofondo o la riduzione/perdita del segnale CISH. La sostituzione di uno qualsiasi dei reagenti forniti come componenti del kit può invalidare i risultati del dosaggio.

Procedura Giorno 1

1. Preparazione dei reagenti

- **Xilene** (2 vaschette), **EtOH al 100%** (3 vaschette)
 - Chiudere ermeticamente e conservare fino a una settimana a temperatura ambiente (15–30 °C) o fino alla preparazione di 100 vetrini.
- **Serie di etanolo (EtOH)**

- o Preparare diverse vaschette con EtOH al 70%, 85%, 95% e 100%.
- o Chiudere ermeticamente e conservare fino a una settimana a temperatura ambiente (15–30 °C) o fino alla preparazione di 100 vetrini.

Contrassegnare correttamente ogni reagente di lavaggio e prendere nota dell'ordine di utilizzo durante la procedura, mantenendo in seguito lo stesso ordine.

2. Sparaffinatura

Nota: preparare una quantità sufficiente di reagenti per ciascuna vaschetta necessaria per il numero di vetrini da analizzare. Ogni lavaggio richiede un volume di reagente a parte. Se non è possibile procedere immediatamente con la seconda fase, asciugare i vetrini all'aria dopo averli immersi per tre volte in EtOH al 100%, invece di lavare i vetrini per tre volte in dH₂O.

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| a) Immergere in xilene | 2 volte, 5 minuti per volta |
| b) Immergere in EtOH al 100% | 3 volte, 3 minuti per volta |
| c) Lavare in dH ₂ O | 3 volte, 2 minuti per volta |

Per ottenere risultati ottimali e riproducibili è necessario che l'operazione di sparaffinatura sia completa.

3. Pretrattamento termico

Nota: i vetrini devono essere fatti bollire o riscaldati ad una temperatura ≥ 98 °C per 15 minuti nella soluzione per pretrattamento termico (**reagente A**). Non riscaldare eccessivamente i vetrini, controllando che non venga superata la temperatura di 98-100 °C. Per questa fase si consiglia di utilizzare la piastra riscaldante. (Per i protocolli che utilizzano una pentola a pressione con indicatore di pressione e temperatura o un forno a microonde con indicatore di temperatura, contattare l'Assistenza tecnica di Invitrogen all'indirizzo techsupport@invitrogen.com). La soluzione per pretrattamento termico (**reagente A**) può essere utilizzata per due volte prima del suo smaltimento.

- a) Posizionare i vetrini nell'apposito supporto.
- b) Riscaldare la soluzione per pretrattamento termico (**reagente A**) in un becher posto su piastra riscaldante fino a quando non bolle costantemente e non viene raggiunta una temperatura ≥ 98 °C. Per evitare l'evaporazione del tampone, è necessario coprire il becher con un coperchio di vetro o con un foglio di alluminio.
- c) Mettere i vetrini nella soluzione bollente, coprire il becher, cominciare il cronometraggio quando la temperatura raggiunge i 98 °C oppure quando ricompaiono nuovamente le bollicine di bollitura e lasciare bollire per 15 minuti. Verificare che la temperatura rimanga a 98-100 °C.
- d) Trasferire immediatamente i vetrini in dH₂O a temperatura ambiente (15–30 °C).
- e) Lavare in dH₂O tre volte, 2 minuti per volta.

4. Digestione enzimatica

Nota: per la maggior parte dei tessuti mammari, una digestione enzimatica di 5 minuti a temperatura ambiente (15–30 °C) consente di ottenere risultati CISH ottimali. Il tempo di digestione deve essere modificato in base ai risultati iniziali del periodo di 5 minuti di digestione. Può essere necessario un diverso tempo di incubazione con gli enzimi, a seconda dello spessore dei tessuti e del metodo di fissazione. Da uno studio sulla digestione enzimatica è emerso che il tempo di digestione può variare da 2 a 20 minuti, fornendo un segnale CISH soddisfacente per la valutazione del gene HER2 in una serie di reperti di tessuto mammario. In uno studio di concordanza per supportare l'utilizzo di CISH rispetto a FISH, dove sono stati utilizzati campioni di tessuto mammario neoplastico preparati non più di 12 mesi prima della data dello studio, una digestione enzimatica di 5 minuti ha fornito segnali CISH ottimali per la valutazione del gene HER2.⁽²⁸⁾

- a) Portare il reagente per pretrattamento enzimatico (**reagente B**) a temperatura ambiente (15–30 °C).
- b) Aggiungere una quantità sufficiente di **reagente B** per coprire la sezione di tessuto e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (15–30 °C).
- c) Lavare in dH₂O 3 volte, 2 minuti per volta.

5. Disidratare in una serie graduata di etanolo:

- | | |
|-----------------|----------|
| a) EtOH al 70% | 2 minuti |
| b) EtOH al 85% | 2 minuti |
| c) EtOH al 95% | 2 minuti |
| d) EtOH al 100% | 2 minuti |

- e) EtOH al 100% 2 minuti

6. Asciugare all'aria per ≥ 20 minuti o fino ad asciugatura completa. Se necessario, contrassegnare i vetrini con una matita.

7. Denaturazione e ibridazione

Nota: utilizzare un ciclatore termico per PCR con un comparto vetrini o un blocco riscaldante con un display digitale per la temperatura e una camera di umidificazione con incubatore a 37 °C o strumentazione simile. Verificare che l'umidità delle camere venga mantenuta in modo adeguato. L'ibridazione eseguita per periodi di tempo più brevi può fornire un segnale più debole. La denaturazione della sonda ad una temperatura inferiore a quella raccomandata dal protocollo può fornire risultati con segnale CISH debole o assente. La modifica dei tempi di incubazione può fornire un segnale debole o una colorazione di sottofondo.

- a) Aggiungere 15 μ l della sonda HER2 (**reagente C**) al centro del vetrino coprioggetto da 22 x 22 mm. A seconda della dimensione del tessuto può essere necessario utilizzare una quantità maggiore o minore di sonda. Utilizzare il seguente volume di sonda, in base alle dimensioni del vetrino coprioggetto:
- 18 x 18 mm 10 μ l
 - 22 x 22 mm 15 μ l
 - 24 x 30 mm 20 μ l
- b) Posizionare il vetrino coprioggetto, con il lato della sonda verso il basso, sull'area corretta del campione di tessuto posto sul vetrino. Al posto dei tradizionali vetrini coprioggetto è possibile utilizzare i coprivetrini per CISH UnderCover™ di Invitrogen. Quando vengono utilizzati i coprivetrini per CISH UnderCover™, staccare la carta di protezione e posizionare il vetrino coprioggetto esposto (dove è stata rimossa la carta) sull'area del vetrino portaoggetto, in modo da coprire il campione di tessuto. Premere sui margini del nastro adesivo per sigillare il vetrino coprioggetto ed evitare così l'evaporazione. **NON ESERCITARE LA PRESSIONE SULLA PARTE CENTRALE DEL VETRINO COPRIOGGETTO.**
- c) Quando viene utilizzato un vetrino coprioggetto convenzionale, è necessario sigillare per evitare l'evaporazione durante l'incubazione. Per sigillare è possibile utilizzare una siringa da 5 ml e un ago da 18G x 12 mm. Riempire la siringa con colla polimerica e applicarne uno strato sottile sui margini del vetrino coprioggetto, ricoprendo anche una piccola parte del vetrino portaoggetto.
- d) Lasciare asciugare la colla polimerica (~10 minuti) per evitare che il vetrino coprioggetto si sposti.
- e) La denaturazione e l'ibridazione vengono eseguite utilizzando un ciclatore termico per PCR con un comparto vetrini o un blocco riscaldante con display digitale per la temperatura, insieme ad una camera di umidificazione e un incubatore a 37 °C.
- 1) Quando viene utilizzato un ciclatore termico per PCR con un comparto vetrini, denaturare a 95 °C (± 1 °C) per 5 minuti e quindi incubare per tutta la notte (10–18 ore) a 37 °C (± 1 °C).
 - 2) Quando vengono utilizzati un blocco riscaldante e una camera di umidificazione con incubatore a 37 °C, denaturare a 95 °C (± 1 °C) per 5 minuti e quindi incubare per tutta la notte (10–18 ore) a 37 °C (± 1 °C) in camera di umidificazione.

Procedura Giorno 2

8. Preparazione dei reagenti

- **PBS (tampone fosfato isotónico)**
 - o Aggiungere una confezione di PBS in polvere (**reagente E1**) a 1 l di dH₂O. Miscelare.
- **Tampone PBS/Tween 20 (Tween 0,01%)**
 - o Aggiungere 10 gocce di Tween 20 al 50% (**reagente E2**) ad 1 l di PBS (la soluzione sopra descritta). Miscelare.
 - o Conservare a temperatura ambiente (15–30 °C) per un periodo non superiore a una settimana.
- **Soluzione substrato-cromogeno (DAB)**
 - o Preparare questa soluzione **immediatamente prima dell'uso**.
 - o Aggiungere una goccia di ciascun reagente (**I1, I2, I3**) ad 1 ml di dH₂O. Miscelare bene.
- **H₂O₂ al 3% in metanolo assoluto**
 - o Aggiungere una parte di H₂O₂ al 30% a 9 parti di metanolo.
 - o Chiudere ermeticamente e conservare fino a una settimana a temperatura ambiente (15–30 °C) o fino alla preparazione di 100 vetrini.
- **Xilene (2 rack portavetrini)**

- Chiudere ermeticamente e conservare fino a una settimana a temperatura ambiente (15–30 °C) o fino alla preparazione di 100 vetrini.

9. Lavaggio stringente

Nota: l'utilizzo di una temperatura superiore a quella raccomandata per la procedura può causare una riduzione o la perdita totale del segnale CISH. I lavaggi ad una temperatura troppo bassa possono causare un elevato sottofondo. Utilizzare un termometro calibrato per assicurare che venga raggiunta e mantenuta la temperatura del bagno termostatico.

- Accendere il bagno termostatico a 70 °C (± 1 °C) e portarlo alla temperatura desiderata.
- Preparare due vaschette Coplin contenenti tampone SSC (**reagente D**), mantenendo uno a temperatura ambiente e riscaldando l'altro a 70 °C.
- Staccare la colla polimerica o togliere il coprivetrino UnderCover™. **Non lasciare essiccare la sezione di tessuto.**
- Per rimuovere il vetrino coprioggetto senza danneggiare il tessuto, immergere prima il vetrino in SSC a temperatura ambiente per ~2–3 minuti fino a quando il vetrino coprioggetto non si stacca facilmente. A questo punto passare alla fase seguente.
- Lavare rapidamente i vetrini nella vaschetta con SSC a temperatura ambiente (15–30 °C) e quindi immergere i vetrini per 5 minuti nella vaschetta Coplin con SSC nel bagno termostatico a 70 °C (± 1 °C).
- Lavare i vetrini in dH₂O 3 volte, 2 minuti per volta.

10. Immunoidentificazione

- Immergere i vetrini in H₂O₂ al 3% in metanolo al 100% per 10 minuti.
- Lavare in PBS/Tween 20 (0,01%) 3 volte, 2 minuti per volta.
- Aggiungere CAS-Block™ (**reagente F**): 2–3 gocce per vetrino o una quantità sufficiente per coprire il tessuto e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (15–30 °C).
- Tamponare il **reagente F** con carta da laboratorio. Non risciacquare.
- Aggiungere gli anticorpi anti-digossigenina murini (**reagente G**): 2–3 gocce per vetrino o una quantità sufficiente per coprire il tessuto e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (15–30 °C).
- Lavare in PBS/Tween 20 (0,01%) 3 volte, 2 minuti per volta.
- Aggiungere gli anticorpi di capra anti-topo coniugati con HRP (**reagente H**): 2–3 gocce per vetrino o una quantità sufficiente per coprire il tessuto e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (15–30 °C) in camera di umidificazione.
- Lavare in PBS/Tween 20 (0,01%) 3 volte, 2 minuti per volta.
- Durante il lavaggio, preparare la soluzione substrato-cromogeno DAB e aggiungere una goccia di ciascun reagente (**reagenti I1, I2, I3**) a 1 ml di dH₂O.
- Aggiungere la soluzione substrato-cromogeno (DAB): 2–3 gocce per vetrino o una quantità sufficiente per coprire il tessuto e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (15–30 °C) in camera di umidificazione.
- Posizionare i vetrini nell'apposito supporto.
- Risciacquare in acqua corrente per 2 minuti.

11. Colorazione di contrasto e montaggio del vetrino

Nota: eseguire una breve colorazione di contrasto per 3–5 secondi ed esaminare il tessuto al microscopio senza il vetrino coprioggetto. Eseguire la colorazione di contrasto per altri 3–5 secondi se si desidera una colorazione dei nuclei più intensa. Il tempo della colorazione di contrasto dipende dal tipo di tessuto utilizzato. Si sconsiglia una colorazione di contrasto troppo scura in quanto potrebbe mascherare i segnali di colorazione positivi.

- Eseguire la colorazione di contrasto del tessuto con ematossilina (**reagente J**) per 3–5 secondi.
- Risciacquare in acqua corrente per 2 minuti.
- Disidratare in una serie graduata di EtOH per 2 minuti in ciascun grado (70%, 85%, 95%, 100%, 100%, conservata dal Giorno 1 e utilizzata nello stesso ordine).
- Immergere in xilene: 2 volte, 2 minuti per volta. Il lavaggio di xilene **deve essere** diverso da quello utilizzato nel Giorno 1. È possibile riutilizzarlo per questa fase per una settimana o fino alla preparazione di 100 vetrini.
- Coprire il vetrino coprioggetto utilizzando la soluzione di montaggio Histomount™ (**reagente K**).
- Conservare i vetrini a temperatura ambiente (15–30 °C) per una successiva analisi dei risultati.

Limiti della procedura

- Il kit SPOT-Light® HER2 CISH potrebbe non rilevare il 5% dei tumori mammari riferiti⁽¹⁰⁾ che risultano positivi all'esame immunohistochimico (IHC) ma negativi per l'amplificazione del gene HER2.
- Il CISH è una procedura multifase che richiede una formazione specifica all'utilizzo dei reagenti corretti, alla selezione dei tessuti, alle tecniche di fissazione, trattamento e preparazione dei vetrini CISH e all'interpretazione dei risultati della colorazione.
- La colorazione tissutale dipende dalla preparazione e dal trattamento del campione di tessuto prima della colorazione. Una colorazione di contrasto eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.
- Qualsiasi deviazione dalla procedura di analisi consigliata può invalidare i risultati attesi; per questo motivo è importante impiegare e documentare appropriate misure di controllo. Gli operatori che non seguono la procedura di analisi consigliata devono assumersi la responsabilità dell'interpretazione dei risultati dei campioni ottenuti in tali circostanze.
- Il kit SPOT-Light® HER2 CISH è stato ottimizzato esclusivamente per l'identificazione e la quantificazione del gene HER2/neu in nuclei in interfase di campioni di tessuto di tumori mammari umani fissati in formalina e inclusi in paraffina. Altri tipi di campioni o di fissativi non sono stati convalidati.
- L'interpretazione clinica dei risultati delle analisi deve essere eseguita nel contesto anamnestico della paziente e di altri risultati diagnostici ottenuti in laboratorio.

Controllo di qualità

Controlli positivi e negativi su singolo vetrino

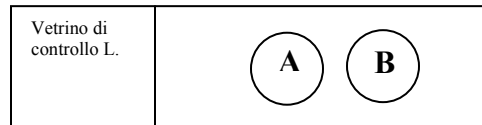


Immagine 1. Il vetrino di controllo L contiene una linea cellulare A non amplificata (MCF-7) e una linea cellulare B amplificata (SK-OV-3). Nota: le linee cellulari non sono riportate in scala e sono più piccole di quelle indicate nel disegno.

- Il segnale CISH deve essere netto, di colore bruno e facile da valutare.
- I vetrini di controllo in dotazione (**vetrino L**) contengono due sezioni da 4 µm prelevate da blocchi di cellule FFPE provenienti da due diverse linee cellulari. Questi vetrini devono essere utilizzati come controlli per la procedura. **La linea cellulare A (MCF-7)** non è amplificata e possiede ≤ 5 segnali o punti per ogni nucleo. **La linea cellulare B (SK-OV-3)** è amplificata e ha l'aspetto di piccoli o grandi cluster DAB presenti all'interno del nucleo.
- Il vetrino di controllo con le linee cellulari deve essere analizzato insieme ad ogni analisi dei vetrini del paziente e deve essere trattato allo stesso modo delle sezioni di tessuto.
- Se il vetrino di controllo (**vetrino L**) risulta negativo per entrambe le linee cellulari A e B, questo indica che si è verificato un errore durante la procedura CISH.
- La linea cellulare del controllo positivo (B), in grado di dimostrare l'amplificazione del gene HER2, deve essere esaminata per prima per appurare il funzionamento corretto di tutti i reagenti. La presenza di cluster di geni o di un numero superiore a 5 singoli segnali o punti all'interno del nucleo di ogni singola cellula è indicativa della reattività positiva attesa. Se il controllo positivo non riesce a dimostrare la presenza di cluster o di un numero superiore a 5 singoli segnali per nucleo nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma, i risultati ottenuti dai campioni del paziente non devono essere considerati validi.
- La linea cellulare del controllo negativo o normale (A), in grado di dimostrare l'assenza di amplificazione del gene HER2, deve contenere un numero uguale o inferiore a 5 punti all'interno del nucleo di ogni cellula.
- Se si verifica una colorazione non specifica dei nuclei del controllo normale (A), i risultati ottenuti dai campioni del paziente non devono essere considerati validi.
- Se si verifica una colorazione non specifica, in genere questa ha un aspetto di colorazione diffusa. A volte è possibile osservare una colorazione bruna sporadica al di fuori dei nuclei nelle sezioni di tessuto che hanno subito una fissazione eccessiva in formalina. In questi casi i risultati devono essere interpretati con cautela. La colorazione non specifica non deve essere confusa con i segnali CISH positivi.
- Se utilizzato, un tessuto per il controllo positivo composto da tessuto mammario neoplastico in grado di dimostrare l'amplificazione del gene HER2 deve evidenziare la presenza di cluster di geni o di un numero superiore a 5 singoli segnali o punti per nucleo nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma, un fattore indicativo della reattività positiva attesa. Se il tessuto per il controllo positivo non riesce a evidenziare la presenza di cluster o di un numero superiore a 5 singoli punti per nucleo in oltre il 50% delle cellule di carcinoma, i risultati ottenuti dai campioni del paziente non devono essere considerati validi.
- Se utilizzato, un tessuto per il controllo negativo composto da tessuto mammario neoplastico in grado di dimostrare l'assenza di amplificazione del gene HER2 deve contenere un numero inferiore a 5 segnali per nucleo nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma.
- In generale, la presenza di non più di due segnali o punti nei nuclei cellulari della porzione di tessuto normale (cellule epiteliali o stromali normali nel tumore) di un controllo positivo conferma l'assenza di reattività crociata tra la sonda e i reagenti per l'immunoidentificazione e i componenti delle cellule o dei tessuti. Se si verifica una colorazione non specifica dei nuclei della porzione di tessuto normale del controllo positivo, i risultati ottenuti dai campioni del paziente non devono essere considerati validi.
- È necessario convalidare le modifiche nella preparazione dei tessuti e nelle procedure tecniche del laboratorio dell'operatore poiché possono causare una significativa variabilità nei risultati, rendendo necessaria l'adozione periodica di controlli interni in aggiunta alle seguenti procedure.

Interpretazione

Valutazione dell'adeguatezza dei vetrini

I punti (segnali) HER2 CISH devono essere piccoli ma chiaramente distinguibili con un obiettivo 20–40X. I punti presentano un colore bruno rispetto alla colorazione di contrasto.

Se non sono presenti punti visibili nel campione, è necessario ripetere il dosaggio. Contattare l'Assistenza tecnica di Invitrogen al numero verde 1-800-955-6288 (solo per gli Stati Uniti) per discutere le possibili cause del problema.

Aspetto del segnale CISH – fare riferimento all'Appendice A, "Guida all'interpretazione del test HER2 CISH"

I punti HER2 CISH possono avere il seguente aspetto:

- Punto singolo (**Figura G**). Nelle cellule normali o tumorali i punti singoli hanno margini lisci e arrotondati. Ogni singolo punto rappresenta una singola copia del gene HER2.
- Coppia (**Figura H**). I punti appaiono come "coppie" e non rappresentano un vero e proprio piccolo cluster. Se i due segnali sono separati da una distanza inferiore al diametro di uno dei due punti, essi devono essere considerati come un singolo punto. La coppia è il risultato della divisione dei cromosomi, con il segnale che risiede su ciascuna delle due cromatidi sorelle.⁽²⁹⁾
- Piccolo cluster (**Figura E**). I piccoli cluster sono gruppi di segnali di forma irregolare che hanno un diametro 3–5 volte più grande di quello di un singolo punto. Come riferimento è possibile utilizzare un singolo punto presente nelle cellule epiteliali normali o tumorali dello stesso vetrino.
- Grande cluster (**Figura A**). I grandi cluster sono gruppi di segnali di forma irregolare che hanno un diametro superiore a 5 volte il diametro di un singolo punto. Come riferimento va utilizzato un singolo punto presente nelle cellule epiteliali normali o tumorali dello stesso vetrino.

Ingrandimento del	segnale CISH
10X	I singoli punti sono appena visibili e non facilmente riconoscibili.
20X	I singoli punti sono piccoli ma chiaramente visibili.
40X	I singoli punti sono facilmente identificabili.
60X o 100X	Ingrandimenti non necessari.

Scelta del campo da esaminare per il conteggio dei segnali HER2 CISH:

- Utilizzando gli obiettivi 4X–20X, esaminare il campione CISH colorato per identificare le aree maggiormente rappresentative del carcinoma invasivo dal punto di vista istopatologico. Evitare le aree necrotiche, i segnali sovrapposti a causa della sovrapposizione di nuclei e i nuclei con segnali di debole intensità. Evitare componenti di carcinoma intraduttale (DCIS) dei carcinomi invasivi. Valutare la possibile eterogeneità intratumorale dello stato del gene HER2 prima del conteggio CISH.
- Se il campione risulta omogeneo, scegliere per il conteggio dei segnali un'area di tessuto con forti segnali CISH. Procedere al conteggio dei segnali.
- Se il campione possiede una eterogeneità intratumorale dello stato del gene HER2 nel componente del carcinoma invasivo, scegliere per il conteggio dei segnali le aree che rappresentano ogni stato del gene HER2. Un campione di tessuto è considerato eterogeneo quando lo stato del gene HER2 (cellule amplificate e non amplificate) varia nelle differenti aree della stessa sezione di un carcinoma mammario primario. È necessario esaminare le cellule in ogni area eterogenea per determinare quale stato del gene HER2 (amplificato o non amplificato) predomina in più del 50% della sezione del tumore. Procedere con il conteggio dei segnali nell'area in cui lo stato del gene HER2 è predominante per questo tumore.

Conteggio dei segnali

- Utilizzare un obiettivo 40X. Se necessario è possibile utilizzare un obiettivo a maggiore ingrandimento, ma non è necessario usare l'immersione in olio.
- Fare riferimento all'**Appendice A**, "Guida all'interpretazione del test HER2 CISH".
- I singoli geni HER2 sono visibili come piccoli punti rotondeggianti (**Figura G**).
- Non contare i nuclei sovrapposti né le aree in cui i nuclei non sono visibili. Contare solo i segnali CISH che si trovano all'interno dei nuclei. Escludere i segnali sporadici fuori dai nuclei, di solito dovuti a residui di DNA del gene HER2 fuoriusciti in seguito al turnover delle cellule tumorali.

Assenza di amplificazione

- Definita come 1–5 punti singoli nella maggioranza (>50%) delle cellule tumorali nell'area di tessuto selezionata.
- Non è necessario contare i punti in 30 cellule. Facoltativamente, servirsi del foglio di lavoro contenuto nell'**Appendice B**, "Foglio per il punteggio HER2 CISH" per la conta delle cellule. Per ottenere una diagnosi chiara di assenza di amplificazione, registrare i risultati come media della conta totale in 30 cellule.

Amplificazione

- o Definita come:
 - o >5 punti nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma nell'area di tessuto selezionata oppure
 - o Presenza di grandi cluster nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma nell'area di tessuto selezionata oppure
 - o Un insieme di punti multipli e grandi cluster nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma nell'area di tessuto selezionata oppure
 - o Un insieme di punti multipli e piccoli cluster nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma nell'area di tessuto selezionata oppure
 - o Piccoli cluster nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma nell'area di tessuto selezionata.
- o In tutti i casi sopra descritti non è necessario contare i punti in 30 cellule. Facoltativamente, servirsi del foglio di lavoro contenuto nell'**Appendice B**, "Foglio per il punteggio HER2 CISH" per la conta delle cellule. Per ottenere una diagnosi chiara di amplificazione, registrare i risultati come media della conta totale in 30 cellule. Per il conteggio, considerare i piccoli cluster equivalenti a 5 punti e i grandi cluster equivalenti a 10 punti.
 - o Razionale: l'assegnazione di un numero specifico di punti ai cluster piccoli e grandi è arbitraria a fini quantitativi. Le cellule normalmente possiedono due copie del gene HER2. Le cellule in cui è avvenuta la replicazione del DNA ma che non si sono ancora divise possiedono 4 copie del gene. Per questo motivo la presenza di un piccolo cluster indica un'amplificazione e contiene almeno 5 copie del gene. I grandi cluster, di dimensione almeno doppia di quella dei piccoli cluster, hanno almeno 10 copie del gene.
- **Casi non definiti di amplificazione o assenza di amplificazione**

Interpretare con cautela i campioni che non appartengono chiaramente alle categorie di amplificazione o assenza di amplificazione. Questi campioni mostrano 4–6 punti nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma nel campo in esame selezionato. Se il numero medio di punti si trova tra 4 e 6 dopo il conteggio di 30 cellule tumorali, sarà necessario contare altre 30 cellule, per un totale di 60 cellule.

Se vi sono ancora dubbi, ripetere il dosaggio su un nuovo vetrino. Registrare i risultati utilizzando il foglio di lavoro dell'**Appendice B**, "Foglio per il punteggio HER2 CISH".

 1. Contare i punti in 30 cellule tumorali nell'area di tessuto selezionata. Se sono presenti piccoli cluster, fare riferimento al punto n. 4 sottostante.
 2. Sommare il numero di punti nelle 30 cellule e calcolare la media.
 3. Registrare il risultato in base alla media di 60 cellule.
 4. Se viene osservato un insieme di punti singoli e piccoli cluster (a causa della formazione di cluster da parte di punti singoli) o se vengono osservati solo piccoli cluster:
 - conteggiare ogni piccolo cluster come 5 punti;
 - è possibile utilizzare un singolo punto presente in cellule epiteliali normali o tumorali dello stesso vetrino come riferimento per determinare da cosa è rappresentato un piccolo cluster.
 5. Registrare i risultati come la media della conta totale in 60 cellule per ottenere una diagnosi di amplificazione o assenza di amplificazione secondo le linee guida Invitrogen.
- **Registrazione dei risultati**

I risultati possono essere registrati utilizzando il foglio di lavoro dell'Appendice B, "Foglio per il punteggio HER2 CISH". La registrazione dello stato del gene HER2 deve essere effettuata secondo le linee guida Invitrogen, in particolare nei casi dubbi di amplificazione o assenza di amplificazione.

Riepilogo dell'interpretazione

Amplificazione	>5 punti, o grandi cluster, o un insieme di punti multipli e grandi cluster, o un insieme di punti multipli e piccoli cluster, o piccoli cluster del gene HER2 presenti per nucleo nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma nell'area di tessuto selezionata per il conteggio. Vedere le Figure A, B, C, D e E dell'Appendice A, "Guida all'interpretazione del test HER2 CISH". I grandi cluster sono gruppi di segnali di forma irregolare che hanno un diametro superiore a 5 volte il diametro di un singolo punto. Come riferimento va utilizzato un singolo punto presente nelle cellule epiteliali normali o tumorali dello stesso vetrino. Vedere Appendice A, Figura A. I piccoli cluster sono gruppi di segnali di forma irregolare che hanno un diametro 3–5 volte più grande di quello di un singolo punto. Come riferimento va utilizzato un singolo punto presente nelle cellule epiteliali normali o tumorali dello stesso vetrino. Vedere Appendice A, Figura E.
Assenza di amplificazione	1–5 punti del gene HER2 presenti per nucleo nella maggioranza (>50%) delle cellule di carcinoma nell'area di tessuto selezionata per il conteggio. Vedere Appendice A, Figura F, Figura G e Figura H. I singoli punti hanno margini lisci e arrotondati e sono presenti nelle cellule normali e in quelle tumorali.

Valori attesi

La prevalenza del gene HER2 amplificato nella popolazione generale di donne con carcinoma mammario è del 18–30%.^(8,9) Quando l'amplificazione del gene HER2 è stata confrontata all'iperespressione della proteina HER2, gli studi hanno dimostrato che fino al 5% delle pazienti con carcinoma mammario risulta positivo per l'iperespressione della proteina testata tramite metodi immunohistochimici (IHC), ma risulta negativo per l'amplificazione del gene HER2.⁽¹⁰⁾

Caratteristiche specifiche di prestazione

Prestazione clinica

La sicurezza e l'efficacia del kit SPOT-Light® HER2 CISH sono state valutate in uno studio comparativo di tre test: il kit SPOT-Light® HER2 CISH, il PathVysion® (FISH) e l'HercepTest™. Lo studio ha interessato due gruppi di casi: 226 casi consecutivi e 60 casi supplementari. I casi consecutivi sono stati selezionati tra casi consecutivi di carcinoma mammario invasivo esaminati durante l'assistenza delle pazienti in due centri dello studio (centro A e centro B). I casi supplementari comprendevano casi con punteggio di 2+ tramite metodi immunohistochimici (IHC) (con anticorpi AB8) durante l'assistenza delle pazienti nel centro A.

A. Casi consecutivi

La seguente tabella riassume la distribuzione dei risultati di CISH e FISH in relazione ai punteggi dell'HercepTest™. Il test è stato considerato valido quando il vetrino colorato con il metodo in esame era ritenuto accettabile per la valutazione.

Tabella 1: risultati di IHC, FISH e CISH

Espressione della proteina, punteggio HercepTest™	0	1	2	3	Totale
Casi IHC (N)	141	19	21	40	221
(%) ¹	63,8%	8,6%	9,5%	18,1%	100%
Rapporto geni con stato HER2 nella FISH					
Numero di casi FISH validi ²	140	19	21	38	218
N. geni amplificati (%) ³	1 (0,5)	0 (0,0)	5 (2,3)	31 (14,2)	37
N. geni non amplificati (%) ³	139 (63,8)	19 (8,7)	16 (7,3)	7 (3,2)	181
Copie dei geni con stato HER2 nella CISH					
Numero di casi CISH validi ²	132	17	19	38	206
N. geni amplificati (%) ³	1 (0,5)	0 (0,0)	3 (1,5)	32 (15,5)	36
N. geni non amplificati (%) ³	131 (63,6)	17 (8,3)	16 (7,8)	6 (2,9)	170

¹ % = N ÷ N totale × 100%

² Numero di casi FISH (o CISH) validi con corrispondente punteggio IHC.

³ % = N ÷ numero totale di casi FISH (o CISH) validi × 100%

Tabella 2: concordanza tra CISH e IHC

Risultati CISH	Risultati IHC		Totale
	Positivi (3+)	Negativi (<3+)	
Amplificati	32	4	36
Non amplificati	6	164	170
Totale	38	168	206

20 casi con risultati IHC o CISH assenti o non validi sono stati esclusi dalla tabella.

Concordanza positivi	=	32/38	= 84,2%	(IC al 95%: 68,8%, 94,0%)
Concordanza negativi	=	164/168	= 97,6%	(IC al 95%: 94,0%, 99,4%)
Totale percentuale concordanza	=	(32+164)/206	= 95,1%	(IC al 95%: 91,3%, 97,7%)

I risultati hanno mostrato una concordanza del 95,1% (IC al 95%: 91,3%–97,7%), indicando una forte concordanza tra il kit SPOT-Light® HER2 CISH e l'HercepTest™.

Tabella 3: concordanza tra CISH e FISH

Risultati CISH	Risultati FISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	34	0	34
Non amplificati	2	169	171
Totale	36	169	205

21 casi con risultati FISH o CISH assenti o non validi sono stati esclusi dalla tabella.

Concordanza positivi	=	34/36	=	94,4%	(IC al 95%: 81,3%, 99,3%)
Concordanza negativi	=	169/169	=	100,0%	(IC al 95%: 97,8%, 100,0%)
Totale percentuale concordanza	=	(34+169)/205	=	99,0%	(IC al 95%: 96,5%, 99,9%)

I risultati hanno mostrato una concordanza del 99,0% (IC al 95%: 96,5%–99,9%), indicando una forte concordanza tra il kit SPOT-Light® HER2 CISH e il test PathVysion® HER2. Di conseguenza, la percentuale di concordanza indica che il kit SPOT-Light® HER2 CISH ha fornito risultati equivalenti a quelli del test PathVysion® HER2.

Di seguito viene riportato un riepilogo dei 2 casi discordanti tra il test con sonda HER2 SPOT-Light® e il test con sonda HER2 PathVysion®. I dati relativi a CISH e FISH vengono riportati come media e intervallo e la colonna IHC riporta il punteggio dell'HercepTest™.

Tabella 4: casi discordanti tra FISH e CISH

HER2 CISH (pos)/FISH (neg)				HER2 CISH (neg)/FISH (pos)			
Numero del caso	CISH	FISH	IHC	Numero del caso	CISH	FISH	IHC
(2, 0,98%) ¹							
				A-095-01	4,07 (1,00–10,00)	2,81 (1,67–5,00)	2+
				B-008	2,77 (2,00–4,00)	2,65 (1,00–6,00)	2+

¹% = numero di casi discordanti diviso per il numero totale di casi con FISH e CISH validi del centro corrispondente × 100%

B. Casi IHC 2+ supplementari

Sono stati forniti altri 60 casi supplementari IHC 2+ dal centro A dello studio, che sono stati testati nei centri A e B. I risultati di ciascun centro dello studio hanno dimostrato che il kit SPOT-Light® HER2 CISH ha fornito risultati equivalenti a quelli del test PathVysion® HER2. I risultati della correlazione sono riassunti nelle Tabelle 5 e 6.

Tabella 5: concordanza tra CISH e FISH sui casi IHC 2+ nel centro A dello studio

Risultati CISH	Risultati FISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	6	0	6
Non amplificati	2	46	48
Totale	8	46	54

6 casi con risultati assenti o non validi

Concordanza positivi	=	6/8	=	75,0%	(IC al 95%: 34,9%, 96,8%)
Concordanza negativi	=	46/46	=	100,0%	(IC al 95%: 92,3%, 100,0%)
Totale percentuale concordanza	=	(6+46)/54	=	96,3%	(IC al 95%: 87,3%, 99,6%)

Tabella 6: concordanza tra CISH e FISH sui casi IHC 2+ nel centro B dello studio

Risultati CISH	Risultati FISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	7	2	9
Non amplificati	2	45	47
Totale	9	47	56

4 casi con risultati assenti o non validi

Concordanza positivi	=	7/9	=	77,8%	(IC al 95%: 40,0%, 97,2%)
Concordanza negativi	=	45/47	=	95,7%	(IC al 95%: 85,5%, 99,5%)
Totale percentuale concordanza	=	(7+45)/56	=	92,9%	(IC al 95%: 82,7%, 98,0%)

Tabella 7: casi IHC 2+ discordanti tra CISH e FISH

HER2 CISH (pos)/FISH (neg)				HER2 CISH (neg)/FISH (pos)			
Numero del caso	CISH	FISH	IHC	Numero del caso	CISH	FISH	IHC
Centro A (2, 3,70%)¹							
				S-156-01	2,77 (1,00–5,00)	2,48 (0,50–5,00)	2+
				S-173-01	3,67 (1,00–7,00)	2,34 (0,50–8,00)	2+
Centro B (4, 7,14%)¹							
S-171	5,20 (2,00–8,00)	1,08 (0,50–2,00)	3+	S-156	5,00 (1,00–9,00)	2,23 (1,00–5,00)	3+
S-178	20,00 (20,00–20,00)	1,25 (0,50–2,00)	0	S-183	4,13 (3,00–6,00)	2,73 (1,00–6,00)	0

¹ % = numero di casi discordanti diviso per il numero totale di casi con FISH e CISH validi del centro corrispondente × 100%

C. **Casi HercepTest 2+**

Tutti i casi consecutivi e supplementari sono stati testati con HercepTest™. I casi con punteggio HercepTest™ 2+ sono stati uniti e testati in entrambi i centri dello studio. I risultati di ciascun centro dello studio hanno dimostrato che il kit SPOT-Light® HER2 CISH ha fornito risultati equivalenti a quelli del test PathVysion® HER2. I risultati della correlazione sono riassunti nelle Tabelle 8 e 9.

Tabella 8: concordanza tra CISH e FISH sui casi HercepTest 2+ nel centro A dello studio

Risultati CISH	Risultati FISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	3	0	3
Non amplificati	4	27	31
Totale	7	27	34

2 casi con risultati FISH o CISH assenti o non validi sono stati esclusi dalla tabella.

Concordanza positivi	=	3/7	=	42,9%	(IC al 95%: 9,9%, 81,6%)
Concordanza negativi	=	27/27	=	100,0%	(IC al 95%: 87,2%, 100,0%)
Totale percentuale concordanza	=	(3+27)/34	=	88,2%	(IC al 95%: 72,6%, 96,7%)

Tabella 9: concordanza tra CISH e FISH sui casi HercepTest 2+ nel centro B dello studio

Risultati CISH	Risultati FISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	4	1	5
Non amplificati	1	35	36
Totale	5	36	41

2 casi con risultati FISH o CISH assenti o non validi sono stati esclusi dalla tabella.

Concordanza positivi	=	4/5	=	80,0%	(IC al 95%: 28,4%, 99,5%)
Concordanza negativi	=	35/36	=	97,2%	(IC al 95%: 85,5%, 99,9%)
Totale percentuale concordanza	=	(4+35)/41	=	95,1%	(IC al 95%: 83,5%, 99,4%)

Tabella 10: casi HercepTest 2+ discordanti tra CISH e FISH

HER2 CISH (pos)/FISH (neg)				HER2 CISH (neg)/FISH (pos)			
Numero del caso	CISH	FISH	IHC	Numero del caso	CISH	FISH	IHC
Centro A (4, 11,76%)¹							
				A-095-01	4,07 (1,00–10,00)	2,81 (1,67–5,00)	2+
				B-008-08	1,77 (1,00–4,00)	2,45 (1,00–5,00)	2+
				S-156-01	2,77 (1,00–5,00)	2,48 (0,50–5,00)	2+
				S-173-01	3,67 (1,00–7,00)	2,34 (0,50–8,00)	2+
Centro B (2, 4,88%)¹							
A-023	5,20 (2,00–8,00)	1,49 (0,67–3,50)	2+	B-008	2,77 (2,00–4,00)	2,65 (1,00–6,00)	2+

¹ % = numero di casi discordanti diviso per il numero totale di casi con FISH e CISH validi del centro corrispondente × 100%

D. Casi di polisomia

Due centri dello studio hanno esaminato i casi di polisomia in base alle rispettive pratiche cliniche. Nel centro A, la polisomia del cromosoma 17 è stata definita come la presenza di ≥ 3 segnali CEP17 in almeno il 10% delle cellule tumorali, mentre nel centro B i criteri prevedevano la presenza di ≥ 3 segnali CEP17 in almeno il 30% delle cellule tumorali. La frequenza di tumori con polisomia del cromosoma 17 è stata del 18,68% nel centro A e del 7,91% nel centro B. La percentuale di rilevazione della polisomia nello stesso gruppo di tumori variava in modo significativo tra i due centri del test, a causa della differenza nella definizione utilizzata nelle due diverse sedi. Il livello di concordanza ottenuto indipendentemente in ciascun centro dello studio ha indicato che il kit SPOT-Light® HER2 CISH ha fornito risultati equivalenti a quelli del test PathVysion® HER2. I risultati sono riassunti nelle Tabelle 11 e 12.

Tabella 11: concordanza tra CISH e FISH sui casi di polisomia nel centro A dello studio

Risultati CISH	Risultati FISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	12	0	12
Non amplificati	2	34	36
Totale	14	34	48

3 casi con risultati FISH o CISH assenti o non validi sono stati esclusi dalla tabella.

Concordanza positivi	=	12/14	=	85,7%	(IC al 95%: 57,2%, 98,2%)
Concordanza negativi	=	34/34	=	100,0%	(IC al 95%: 89,7%, 100,0%)
Totale percentuale concordanza	=	(12+34)/48	=	95,8%	(IC al 95%: 85,8%, 99,5%)

Tabella 12: concordanza tra CISH e FISH sui casi di polisomia nel centro B dello studio

Risultati CISH	Risultati FISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	12	1	13
Non amplificati	0	9	9
Totale	12	10	22

0 casi con risultati FISH o CISH assenti o non validi sono stati esclusi dalla tabella.

Concordanza positivi	=	12/12	=	100,0%	(IC al 95%: 73,5%, 100,0%)
Concordanza negativi	=	9/10	=	90,0%	(IC al 95%: 55,5%, 99,8%)
Totale percentuale concordanza	=	(12+9)/22	=	95,5%	(IC al 95%: 77,2%, 99,9%)

Tabella 13: casi discordanti di polisomia tra CISH e FISH

HER2 CISH (pos)/FISH (neg)				HER2 CISH (neg)/FISH (pos)			
Numero del caso	CISH	FISH	IHC	Numero del caso	CISH	FISH	IHC
Centro A (2, 4,17%) ¹							
				A-095-01	4,07 (1,00–10,00)	2,81 (1,67–5,00)	2+
				S-156-01	2,77 (1,00–5,00)	2,48 (0,50–5,00)	2+
Centro B (1, 4,55%) ¹							
A-023	5,20 (2,00–8,00)	1,49 (0,67–3,50)	2+				

¹ % = numero di casi discordanti diviso per il numero totale di casi con FISH e CISH validi del centro corrispondente $\times 100\%$

E. Riepilogo dei risultati del confronto tra il kit SPOT-Light® HER2 CISH e il kit con sonda a DNA PathVysion® HER2

Tabella 14: riepilogo del kit SPOT-Light® HER2 CISH e del kit con sonda a DNA PathVysion® HER2

Tipi di casi	Casi consecutivi	Casi supplementari		Casi equivoci		Casi di polisomia	
		Centro A	Centro B	Centro A	Centro B	Centro A	Centro B
Numero di campioni	205	54	56	34	41	48	22
% concordanza positivi	94,4%	75,0%	77,8%	42,9%	80,0%	85,7%	100,0%
% concordanza negativi	100,0%	100,0%	95,7%	100,0%	97,2%	100,0%	90,0%
% concordanza totale	99,0%	96,3%	92,9%	88,2%	95,1%	95,8%	95,5%

Sensibilità analitica

La sensibilità del kit SPOT-Light® HER2 CISH è stata testata utilizzando sezioni di tessuto mammario neoplastico FFPE con stato del gene HER2 con e senza amplificazione, oltre a linee cellulari FFPE utilizzate nei vetrini di controllo. Il gene HER2 è stato identificato come punto singolo nella sezione di tessuto e nei blocchi di cellule con gene HER2 normale. Ogni campione con o senza amplificazione ha dimostrato un'intensità di colorazione 3+ e una buona morfologia tissutale.

Efficacia dell'ibridazione

L'efficacia dell'ibridazione è stata determinata esaminando 2 campioni di tessuto (1 con amplificazione, 1 senza amplificazione, 10 sezioni ciascuno) e 4 campioni di linee cellulari (2 con amplificazione, 2 senza amplificazione). In ogni campione è stato analizzato il numero di cellule con segnale HER2 in confronto al numero totale di cellule analizzate (100–300 cellule). L'efficacia dell'ibridazione è risultata essere del 94,7–100%. Per la colorazione CISH di 226 campioni clinici provenienti da 3 laboratori, la percentuale di errore per ogni sede è stata rispettivamente di 8,4% (19), 1,3% (3) e 0,9% (2).⁽²⁸⁾

Specificità analitica

Per determinare la specificità sono stati eseguiti studi di metafase su vetrini preparati citogeneticamente ed è stata utilizzata la PCR utilizzando una coppia di primer specifica per il gene HER2 sul modello di sonda a DNA per HER2 ed è stato eseguito il sequenziamento del DNA su entrambe le estremità dei cloni BAC utilizzando la sonda a DNA per l'HER2.

La sonda SPOT-Light® CISH HER2 si è dimostrata in grado di legarsi in modo specifico al locus del gene HER2 sulla banda cromosomica 17q11.2-21. La localizzazione del cromosoma è stata determinata tramite FISH in metafase in linfociti normali; il test con PCR ha dimostrato la presenza della banda DNA desiderata e il sequenziamento del DNA ha dimostrato la corretta sede sul cromosoma e la copertura del gene HER2.

Limiti della procedura

La procedura SPOT-Light® HER2 CISH è stata testata su valori estremi per ciascuno dei seguenti parametri: spessore tissutale, pretrattamento, denaturazione, ibridazione, lavaggio stringente, immunoidentificazione e colorazione di contrasto. Non sono state osservate differenze significative nei risultati della CISH nelle seguenti condizioni:

Tabella 15: limiti della procedura

	Intervali accettabili dei parametri di dosaggio		
Spessore tissutale		4–6 µm	
Pretrattamento termico		99–100 °C	10–20 min
Digestione enzimatica			4–14 min
Denaturazione	Ciclatore termico per PCR	93–98 °C	2–8 min
Ibridazione		30–39 °C	10–18 ore
Lavaggio stringente		60–78 °C	2–8 min
Immunoidentificazione	Coniugato HRP		25v60 min
	Cromogeno DAB		15–60 min
Colorazione di contrasto			3–30 sec

Riproducibilità

Tre lotti distinti del kit SPOT-Light® HER2 CISH sono stati testati su 3 campioni di tessuto mammario neoplastico e 4 campioni di linee cellulari, con diversi livelli di espressione del gene HER2. Non sono state rilevate variazioni nelle prestazioni del dosaggio tra i 3 lotti testati.

Riproducibilità interdosaggio (tra giorni diversi)

Lo studio ha eseguito la riproducibilità interdosaggio della CISH in tre diversi giorni utilizzando campioni di tessuto mammario neoplastico con tre tipi di stato del gene HER2 e tre campioni per ogni tipo di stato. Di seguito viene riportato un riepilogo dei risultati:

Tabella 16: riproducibilità interdosaggio (tra giorni diversi)

Copia del gene	N	Non amplificati	Non amplificati, polisomia	Amplificati
Media N =	9	1,79	3,45	20,22
Dev std	9	0,05	0,12	1,72
CV	9	3%	4%	8%

Studio con diversi osservatori

Tre patologi sono stati addestrati alla lettura di vetrini preparati e colorati con il kit SPOT-Light® HER2 CISH. Per verificare la loro capacità, a ciascun patologo sono stati forniti da Invitrogen otto vetrini precolorati (2 con amplificazione e 6 senza). In entrambi i tipi di casi (con amplificazione e senza), tutti i campioni (100%) sono stati interpretati correttamente.

Tabella 17: riproducibilità tra osservatori

ID vetrino	N. vetrino.	Segnale CISH, media punti/cellule HER2 CISH e stato del gene HER2		
		Osservatore 1	Osservatore 2	Osservatore 3
1	Campione 1 (NAM)	2 punti NAM	1-5 punti NAM	1-2 NAM
2	Campione 2 (AM)	Grande cluster + punti multipli AM	Grande cluster + punti AM	>10 AM
3	Campione 3 (NAM)	2-5 NAM	1-5 NAM	3-5 NAM
4	Campione 4 (NAM)	2-4 NAM	2,8 NAM	3-5 NAM
5	Campione 5 (NAM)	2 NAM	1-5 NAM	1-2 NAM
6	Campione 6 (NAM)	2-5 NAM	1-5 NAM	4 NAM
7	Campione 7 (AM)	Grande cluster + punti multipli AM	Grande cluster AM	Grande cluster + punti multipli AM
8	Campione 8 (NAM)	2-5 NAM	3,4 NAM	4,3 NAM

Riproducibilità tra sedi

Lo studio sulla riproducibilità della CISH tra sedi si è basato su 226 casi consecutivi ripetuti in tre centri. Le percentuali complessive di concordanza per la riproducibilità della CISH con un valore di cutoff per la positività >5 sono state di 99,0%, 98,6% e 98,1%, indicando una forte riproducibilità dei test con il kit SPOT-Light® HER2 CISH.

**Tabella 18: riproducibilità della CISH per tutti i casi consecutivi
Esaminata dai centri A e B**

Centro A Risultati CISH	Centro B: risultati CISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	34	0	34
Non amplificati	2	170	172
Totale	36	170	206

20 casi con risultati CISH assenti o non validi sono stati esclusi dalla tabella.

Totale percentuale concordanza = $(34+170)/206$ 99,0% (IC al 95%: 96,5%, 99,9%)

**Tabella 19: riproducibilità della CISH per tutti i casi consecutivi
Esaminata dai centri C e B**

Centro C Risultati CISH	Centro B: risultati CISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	35	0	35
Non amplificati	3	184	187
Totale	38	184	222

4 casi con risultati CISH assenti o non validi sono stati esclusi dalla tabella.

Totale percentuale concordanza = $(35+184)/222$ 98,6% (IC al 95%: 96,1%, 99,7%)

**Tabella 20: riproducibilità della CISH per tutti i casi consecutivi
Esaminata dai centri C e A**

Centro C Risultati CISH	Centro A: risultati CISH		Totale
	Amplificati	Non amplificati	
Amplificati	32	1	33
Non amplificati	3	171	174
Totale	35	172	207

19 casi con risultati CISH assenti o non validi sono stati esclusi dalla tabella.

Totale percentuale concordanza = $(32+171)/207$ 98,1% (IC al 95%: 95,1%, 99,5%)

Studi di ripetibilità e riproducibilità su sezioni di tessuti consecutivi e di vario spessore

Sono stati condotti studi di ripetibilità e riproducibilità per valutare la ripetibilità e la riproducibilità del kit SPOT-Light® HER2 CISH™ durante il test di tessuti consecutivi di carcinomi mammari con o senza amplificazione e di vario spessore.

I campioni in esame includevano vetrini di tre tipologie di tessuto mammario neoplastico: senza amplificazione HER2 (normale), con amplificazione HER2 borderline e con amplificazione HER2 (elevata). Dieci campioni per ogni blocco di sezioni consecutive con spessore di 4 µm sono stati preparati ed esaminati in base a procedure standard (in condizione controllata), mentre campioni di diverso spessore (da 2 a 8 µm) in ciascun blocco sono stati preparati allo stesso modo e testati in duplicato in base alle procedure standard. I risultati delle analisi sono riportati nelle Tabelle 21-23.

**Tabella 21. Media dei punti HER2 CISH per cellula in sezioni consecutive da 4 µm
(carcinoma mammario con HER2 normale)**

	Numero sezione									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Media punti HER2 CISH per nucleo	1,8	2,0	1,9	2,0	1,6	1,7	1,7	1,6	1,7	2,0
Media HER2	1,8									
DS	0,16									
%CV	8,9									

**Tabella 22. Media dei punti HER2 CISH per cellula in sezioni consecutive da 4 µm
(tumore mammario con *amplificazione borderline* di HER2)**

	Numero sezione									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Media punti HER2 CISH per nucleo	5,4	5,5	5,3	5,8	5,2	6,2	5,7	5,4	5,5	5,8
Media HER2	5,6									
DS	0,30									
%CV	5,4									

Tabella 23. Media dei punti HER2 CISH per cellula in sezioni consecutive da 4 µm (carcinoma mammario con HER2 *amplificato*)

	Numero sezione									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Media punti HER2 CISH per nucleo	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC

Risoluzione dei problemi

Problema	Possibile causa	Azione raccomandata
Segnale debole o assente	1. Le istruzioni sul pretrattamento non sono state seguite. a) Condizioni di pretrattamento termico (tempo o temperatura di incubazione) errate b) Condizioni di pretrattamento enzimatico (tempo o temperatura) errate c) Spessore della sezione di tessuto non ottimale 2. Condizioni di denaturazione errate a) Temperatura di denaturazione errata b) Tempo di denaturazione errato 3. Condizioni di lavaggio stringente errate a) Temperatura di lavaggio stringente errata (superiore a 80 °C) b) Tempo di lavaggio stringente errato 4. Temperatura eccessiva durante la conservazione o il trasporto	1. Controllare che siano state utilizzate le condizioni di pretrattamento corrette. Fare riferimento alla procedura. a) Controllare che siano state utilizzate le condizioni di pretrattamento termico corrette: 15 minuti a 98–102 °C. b) Controllare che siano state utilizzate le condizioni di pretrattamento enzimatico corrette (tempo consigliato: 5 minuti; intervallo: 2–20 minuti). Controllare che l'enzima venga portato a temperatura ambiente (15–30 °C) prima dell'uso. c) A seconda dello spessore del tessuto (4–6 µm) e delle condizioni di fissazione, può essere necessario aumentare o ridurre il tempo ottimale di incubazione per il pretrattamento enzimatico. 2. Controllare che siano state utilizzate le condizioni di denaturazione corrette. Fare riferimento alla procedura. a) Controllare che la temperatura di denaturazione sia di 95 °C (intervallo di 95–98 °C) per il ciclatore termico per PCR e di 90 °C (intervallo di 85–90 °C) per il blocco riscaldante. b) Controllare che il tempo di denaturazione sia di 5 minuti per il ciclatore termico per PCR. 3. Controllare che siano state utilizzate le condizioni di lavaggio stringente corrette. Fare riferimento alla procedura. a) Controllare che il lavaggio stringente sia stato eseguito a 70 °C. Per controllare la temperatura si consiglia l'utilizzo di un termometro calibrato. b) Controllare che sia stato osservato il tempo di incubazione del lavaggio stringente corretto (5 minuti). 4. Controllare le condizioni di conservazione. Il kit SPOT-Light® HER2 CISH va conservato a 2–8 °C. Conservare il Reagente J a temperatura ambiente (15–30 °C).
Morfologia tissutale insoddisfacente	1. Condizioni di pretrattamento termico (tempo o temperatura) errate	1. Controllare che siano state utilizzate le condizioni di pretrattamento termico corrette.

Problema	Possibile causa	Azione raccomandata
	2. Condizioni di pretrattamento enzimatico (tempo o temperatura) errate 3. Condizioni di denaturazione (tempo o temperatura) errate 4. La rimozione del vetrino coprioggetto ha causato un danno fisico al tessuto 5. Il tessuto si è asciugato durante la procedura CISH 6. Spessore tissutale errato 7. Tempo di fissazione errato 8. Fissativo errato	2. Controllare che siano state utilizzate le condizioni di digestione enzimatica corrette. Per la maggior parte dei tessuti mammari neoplastici, si considera ottimale un periodo di 5 minuti a temperatura ambiente (15–30 °C). A seconda dello spessore del tessuto e del tempo di fissazione, può essere necessario aumentare o ridurre il tempo ottimale di incubazione per la digestione. 3. Controllare che siano state utilizzate le condizioni di denaturazione corrette. Fare riferimento alla procedura. 4. Non esercitare pressioni sul vetrino coprioggetto. Immergere prima il vetrino a temperatura ambiente (15–30 °C) in tampone SSC per 2–3 minuti o fino a quando non è possibile rimuovere facilmente il vetrino coprioggetto. 5. A meno che non sia indicato diversamente, non lasciare asciugare il tessuto durante la procedura CISH. 6. Controllare che lo spessore del tessuto sia di 4–6 µm. 7. Controllare che il tessuto sia fissato per 6–48 ore. 8. Controllare che il tessuto sia fissato in formalina tamponata neutra al 10%.
Colorazione di sottofondo	1. Temperatura di lavaggio stringente errata (<70 °C) 2. Eccessiva incubazione con DAB 3. Reagenti errati utilizzati come tampone di lavaggio	1. Controllare che venga utilizzata la temperatura di lavaggio stringente corretta (70 °C). 2. Controllare che il tempo di incubazione con DAB sia di 30 minuti a temperatura ambiente (15–30 °C). 3. Durante le fasi di immunoidentificazione è necessario utilizzare il tampone di lavaggio (reagenti E1 + E2).
Segnali visibili ma difficili da identificare	1. Eccessiva colorazione di contrasto con ematosilina	1. Controllare che la colorazione di contrasto venga eseguita per 3–5 secondi. Se vi fossero dubbi riguardo al tempo ottimale per la colorazione, eseguire la colorazione di contrasto per 3 secondi, quindi lavare per 2 minuti sotto acqua corrente. Controllare al microscopio il tessuto con la colorazione di contrasto. Se la colorazione è ancora troppo leggera, ripeterla per altri 3–5 secondi prima di posizionare il vetrino coprioggetto.
Aree senza segnale	1. Formazione di bollicine d'aria sotto il vetrino coprioggetto dopo l'aggiunta della sonda 2. Volume della sonda insufficiente per la dimensione del tessuto	1. Controllare che non si formino bollicine d'aria quando vengono aggiunti la sonda e il vetrino coprioggetto. 2. Per un tessuto coperto da un vetrino coprioggetto 22 x 22 mm aggiungere ~15 µl di sonda. Per i tessuti di grandi dimensioni, può essere necessario utilizzare una quantità maggiore di sonda o un vetrino coprioggetto più grande (utilizzare 20 µl per un tessuto con vetrino coprioggetto da 24 x 30 mm).

NOTA: se si verifica un problema non riportato nell'elenco precedente o se l'azione raccomandata non consente di risolvere il problema, contattare l'Assistenza tecnica al numero verde 1-800-955-6288 (solo per gli Stati Uniti) oppure inviare un'e-mail all'indirizzo techsupport@invitrogen.com.

BIBLIOGRAFIA

1. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. *Science* 229(4717):974-976, 1985.
2. Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, et al. *Science* 229:976-978, 1985.
3. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, et al. *PNAS* 82(19):6497-6501, 1985.
4. Ross JS, Fletcher JA. *Am J Clin Pathol* 112:S53-S67, 1999.
5. Shak S. *Semin Oncol* 4 (Suppl 12):71-77, 1999.
6. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. *J Clin Oncol* 17:2639-2648, 1999.
7. Ross JS, et al. *The Oncologist* 8: 307-325, 2003.
8. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. *Science* 235:177-82, 1987.
9. Slamon DJ, et al. *Science* 244:707-12, 1989.
10. Pauletti G, et al. *J Clin Oncol* 18(21):3651-3664, 2000.
11. Herceptin (trastuzumab) package insert, Genentech, South San Francisco, CA, www.fda.gov, 2004
12. Heikki Joensuu, et al. *N Engl J Med* 354(8):809-820, 2006
13. Nicols DW, et al. *Ann Clin Laboratory Sci*, 32(1),2002.
14. Bhargava R, et. al. *Am J Clin Path* 123:237-243. 2005.
15. Gong Y, et. al. *Mod Path* 18(8):1015-21, 2005.
16. Zhao J, Wu R, Au A, et al. *Mod Pathol* 15(6):657-665, 2002.
17. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. *Anticancer Res* 24(4):2401-6, 2004.
18. Wixom CR, et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12(3): 248-251, 2004.
19. Diaz LK, et al. *J Histochem Cytochem* 52(4): 501-507, 2004.
20. van de Vijver M, et al. Chromogenic *in-situ* hybridization (CISH) compared with FISH and IHC for detection of HER2 gene amplification: An international validation ring study. 26th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2003.
21. Arnould L, et al. *Br J Cancer* 88:1587-91, 2003.
22. Gupta D, et al. *Am J Clin Pathol* 119:381-87, 2003.
23. Loring P, et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13(2):194-200, 2005.
24. Rueschoff J, et al. HER2 status assessment by chromogenic *in situ* hybridization (CISH) demonstrates high sensitivity for predicting response to Herceptin. 27th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2004.
25. Wolff AC, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 131:18-43, 2007.
26. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. St Louis: CV Mosby Company, 1980.
27. 24. Kiernan, JA. Histological and histochemical methods: theory and practice. New York: Pergamon Press, 1981.
28. Data on file, PMA application & USCAP 2008 Annual Meeting poster presentations, numbers 138, 139, & 140.
29. Cooper K, et al. *J Clin Pathol* 44:406-409, 1991.

MARCHI COMMERCIALI

Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™ e SPT™ sono marchi commerciali di Invitrogen Corporation. SPOT-Light® e Zymed® sono marchi registrati di Invitrogen Corporation. Herceptin® è un marchio registrato di Genentech, Inc. HercepTest™ è un marchio commerciale di Genentech, Inc. PathVysion® è un marchio registrato di Abbott Molecular, Inc.



Invitrogen Corporation

542 Flynn Road

Camarillo • California 93012, USA

Tel. 1-800-955-6288

Per problemi tecnici, inviare un'e-mail all'indirizzo techsupport@invitrogen.com

Per informazioni generali sul kit SPOT-Light® HER2 CISH, inviare un'e-mail all'indirizzo

her2cish@invitrogen.com

URL: www.invitrogen.com/her2cish

Spiegazione dei simboli

	Numero di catalogo		Numero di lotto
	Limiti della temperatura		Produttore
	Contiene materiale sufficiente per <n> test		Rappresentante autorizzato per l'UE
	Utilizzare entro		Diagnostica <i>in vitro</i>
	Consultare le istruzioni per l'uso		Consultare la documentazione allegata



per IVDD 98/79/CE: Invitrogen Ltd., Inchinnan Business Park, 3 Fountain Drive, Paisley, PA4 9RF, Regno Unito

Copyright © Invitrogen Corporation. 16 luglio 2008

Appendice A:

Guida all'interpretazione del test HER2 CISH

Amplificazione del gene HER2

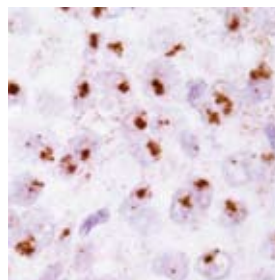
Amplificazione

Amplificazione elevata: >10 punti oppure grandi cluster oppure insieme di punti multipli e grandi cluster del gene HER2 presenti per nucleo oltre il 50% di cellule tumorali. Vedere Figure A, B e C.

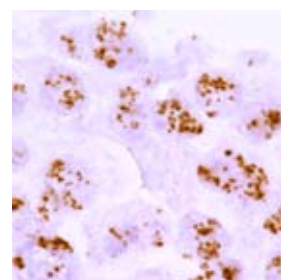
I grandi cluster sono gruppi di segnali di forma irregolare che hanno un diametro superiore a 5 volte il diametro di un singolo punto. Come riferimento va utilizzato un singolo punto presente nelle cellule epiteliali normali o tumorali dello stesso vetrino. Vedere Figura A.

Amplificazione bassa: >5 punti fino a 10 punti, oppure piccoli cluster, oppure insieme di punti multipli e piccoli cluster del gene HER2 presenti per nucleo in oltre il 50% di cellule tumorali. Vedere Figure D e E.

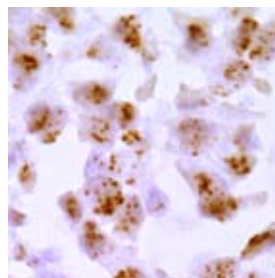
I piccoli cluster sono gruppi di segnali di forma irregolare che hanno un diametro 3–5 volte più grande di quello di un singolo punto. Come riferimento va utilizzato un singolo punto presente nelle cellule epiteliali normali o tumorali dello stesso vetrino. Vedere Figura E.



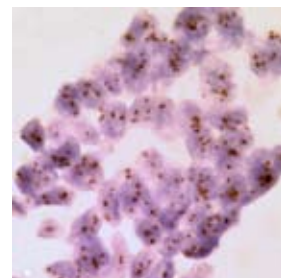
A. Grandi cluster.



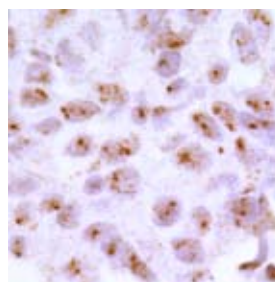
B. Punti multipli (>10 punti).



C. Grandi cluster e punti multipli.



D. >5-10 punti.



E. Piccoli cluster.

Assenza di amplificazione del gene HER2

Assenza di amplificazione

Polisomia: 3–5 punti del gene HER2 presenti per nucleo in oltre il 50% di cellule tumorali. Vedere Figura F.

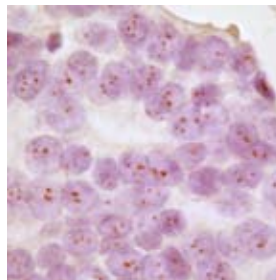
Nelle cellule normali o tumorali i punti singoli hanno margini lisci e arrotondati. Vedere Figura F.

Diploidia: 1–2 punti del gene HER2 presenti per nucleo in oltre il 50% di cellule tumorali. Vedere Figura G.

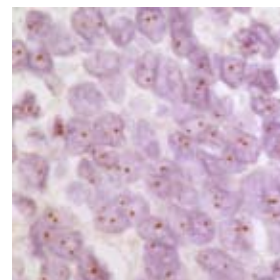
Nelle cellule normali o tumorali i punti singoli hanno margini lisci e arrotondati. Vedere Figura G.

Coppia

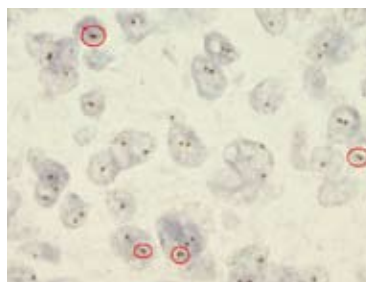
Se due segnali sono separati da una distanza inferiore al diametro di un singolo punto, devono essere considerati come un unico punto. Le coppie appaiono come un insieme di due punti e non rappresentano un vero e proprio piccolo cluster. Vedere Figura H.



F. Polisomia: 3-5 punti.



G. Diploidia: 1-2 punti.



H. Coppia = 1 punto. Per gentile concessione della Dott.ssa Adrienne Morey.

Appendice B: Foglio per il punteggio HER2 CISH

Kit SPOT-Light® HER2 CISH, N. cat. 84-0150

ID registro colorazione analisi: _____

Kit SPOT-Light® HER2 CISH (84-0150) Lotto n.: _____

ID campione: _____

Risultati CISH (registrare il numero di segnali HER2 per ogni cellula esaminata):

Cartella 1. Risultati CISH

N. cellula	Punti o cluster HER2	N. cellula	Punti o cluster HER2	N. cellula	Punti o cluster HER2
1		11		21	
2		12		22	
3		13		23	
4		14		24	
5		15		25	
6		16		26	
7		17		27	
8		18		28	
9		19		29	
10		20		30	

Nota per i cluster: fornire la migliore stima possibile di punti/copie del gene (piccoli cluster = 5 punti, grandi cluster = 10 punti).

Totale dei punti in 30 cellule _____

Media dei punti in 30 cellule _____

Se la media è di 4-6 punti, contare i punti in altre 30 cellule per un totale di 60 cellule e registrare i risultati nella Cartella 2. Se la media è <4 o >6, non è necessario contare altre 30 cellule e il campione può essere registrato come amplificato o non amplificato.

Punteggio CISH

Linee guida Invitrogen per il punteggio HER2 CISH

- Assenza di amplificazione: 1–5 segnali/nucleo nelle cellule tumorali
- Amplificazione: >5 segnali/nucleo o cluster di segnali amplificati/nucleo in oltre il 50% di cellule tumorali

Risultato: ☐ Assenza di amplificazione (≤ 5) ☐ Amplificazione (>5)

Data e firma del tecnico: _____

Data e firma del medico patologo: _____

Cartella 2 (risultati CISH). Se necessario, inserire il numero di punti presenti nel secondo gruppo di 30 cellule:

N. cellula	Punti o cluster HER2	N. cellula	Punti o cluster HER2	N. cellula	Punti o cluster HER2
1		11		21	
2		12		22	
3		13		23	
4		14		24	
5		15		25	
6		16		26	
7		17		27	
8		18		28	
9		19		29	
10		20		30	

Totale dei punti nelle cellule 31–60 _____

Totale dei punti nelle cellule 1–30 _____

Media dei punti in 60 cellule _____

Punteggio CISH

Linee guida Invitrogen per il punteggio HER2 CISH

- Assenza di amplificazione: 1–5 segnali/nucleo nelle cellule tumorali
- Amplificazione: >5 segnali/nucleo o cluster di segnali amplificati/nucleo in oltre il 50% di cellule tumorali

Risultato: ☐ Assenza di amplificazione (≤ 5) ☐ Amplificazione (> 5)

Data e firma del tecnico: _____

Data e firma del medico patologo: _____